操作手順

CONTENTS

I. 増菌培養
II. サンプルからの遺伝子抽出
III. 試薬の調製
IV. 試薬分注およびサンプル溶液の添加
V. LAMP反応および検出
VI. 結果判定
VII. 検査 フローチャート
VIII. アッセイシート

Ⅰ. 増菌培養 Ⅱ. サンプルからの遺伝子抽出

❑ 増菌培養 （図9)【領域B】

【領域B にて操作します】

(増菌培養の例)

① 検体の食品を25g採取します。試料が固体の場合は滅菌したハサミ、ナイフ等で小片に刻みます。

② フィルター付きストマッカー用バッグに採取した食品および、増菌用培地としてプレストン培地100mLを入れ、ストマッカー処理を行い均一化します。

③ ストマッカー処理した増菌培養液10mLを試験管に採り、微好気条件下で42℃、24時間増菌培養します。

❖ レバー類の食品検査の場合は、その成分によってLAMP反応が影響を受けますのでご使用になれません。

❑ サンプルからの遺伝子抽出

【領域B にて操作します】

④ 増菌培養液50μLをそれぞれ別に用意した滅菌チューブ(1.5mL)に採取します。

⑤ Extraction Solution for Foods (EX F) 50μLを添加します。

⑥ ボルテックスミキサーで攪拌後、微量簡易遠心機でスピンダウンします。

⑦ 95℃、5分間の加熱処理を行います。

❖ この操作により感染性がなくなります。

⑧ 加熱処理したチューブを一度スピンダウンした後、1M Tris-HCl:pH7.0(Tris)10μLを添加します。

⑨ キャップを閉め、ボルテックスミキサーで混合し、微量簡易遠心機で室温にて2,000×g、60秒間遠心します。

⑩ 氷上に移し、上清をサンプル溶液とします。

❖ サンプル溶液は原則として直ちに測定してください(0～4℃で4時間保存可能)。

❖ 長期に保存する場合は-80℃以下に保存し凍結融解の繰り返しは避けてください。

図9. 検査の流れ LAMP法と培養法との比較

III. 試薬の調製　IV. 試薬分注・サンプル溶液の添加

❑ 試薬の調製

- ❖ 操作は氷上でおこなってください。
- ❖ マスターミックスは検査毎に調製し、作り置きはしないでください。
- ❖ 調製後のキット試薬は、速やかに凍結保存してください。

【操作は領域Aで行います。】

① -20℃で保存していた酵素以外のキット試薬を室温で解凍し、使用するまで氷上で保存します。酵素は、そのまま氷上で保存します。

② 使用前に酵素以外の試薬をタッピングにて混合しスピンダウンを行います。酵素は、そのままスピンダウンします。

③ 別途用意した1.5mL滅菌チューブに、各試薬を分注します。

- ▨ 各試薬1テストあたり2×Reaction Mix. (RM) 12.5 μL、Primer Mix.Cam (PM Cam) 2.5 μL、Distilled Water (DW) 4 μL、*Bst* DNA Polymerase 1 μLを、陽性・陰性コントロールを含めた必要なテスト数分分注します。
- ❖ 実際のサンプル数＋α分のマスターミックスを調製することにより、滞りなく分注することができます(例: 20サンプル実施の場合、21サンプル分のマスターミックスを調製)。

④ 転倒混和あるいはボルテックスミキサー(1秒間×3回)により十分混合した後、スピンダウンし、マスターミックスとします。なお調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

マスターミックスの調製分量

テスト数	1test	___test
2×Reaction Mix.	12.5 μL	12.5μL× ___ =_____μl
Primer Mix. Cam	2.5 μL	2.5μL× ___ =_____μl
Distilled Water	4μL	4μL× ___ =_____μl
Bst DNA Polymerase	1μL	1μL × ___ =_____μl
Total	20μL	20μL × ___ =_____μl

❑ 試薬分注・サンプル溶液の添加(図10)

- ❖ 操作は氷上でおこなってください。
- ❖ 反応前にチューブにヒビ・キズ等がないことを予め確認してください。

【操作は領域Aで行います。】

① キット添付のPositive Control Cam (PC Cam)と、陰性コントロールとしてDistilled Water (DW)を予め準備しておきます。

- ❖ Distilled Water (DW)の一部を予め分注しておき、陰性コントロールとして領域Cにて使用、保存します。

② 試薬調製用のクリーンベンチ内でLoopamp®反応チューブにそれぞれマスターミックスを20 μLずつ分注し、すべてのキャップを閉じます。

【操作は領域Cで行います。】

③ マスターミックス20 μLが分注されている反応チューブにサンプルを5 μLずつ添加し、ピペッティングで十分に混和します。

- ▨ ピペットの汚染を防ぐため、吸引操作はゆっくりおこなってください。

④ キャップを閉め、スピンダウンします。

⑤ スピンダウン終了後にはチューブ内に気泡がないことを確認してください。

- ▨ ピペットの汚染を防ぐため、吸引操作はゆっくりおこなってください。

図10. 試薬分注およびサンプル溶液の添加

V. LAMP反応および検出

❑LAMP反応および検出【領域D】

◆LAMP反応および検出はリアルタイム濁度測定装置にておこないます。LAMP反応条件は65℃60分間、その後反応停止条件として80℃、2分間とします。

① 使用する20分前までに電源を入れ装置を立ち上げてください。

② 反応前にチューブにヒビ・キズ等がないことを確認してください。

③ チューブを検出部に入れる際は、チューブ内に気泡がないことを確認してください（気泡があると、誤った判定の原因となります）。

◆LA-320C（図11）

① 本体がパソコンに接続されていることを確認し電源を投入してください。

② パソコンを起動し「LA-320C制御ソフト」を起動してください。

③ 測定条件を設定します（各試薬のパラメーター表を参照してください。パラメーター表は弊社担当者に御要請ください。）。

④ 予備加熱終了後、サンプルを測定部にセットし、ホットボンネットを閉めてください。

◇ 反応チューブの確認（ヒビ・キズ、気泡等）を確実におこなってください。

⑤ [測定開始]を確実にクリックし測定を開始します。

◇ [測定開始]をクリックしないとデータが保存されず、判定ができなくなってしまいます。

⑥ 32チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線、判定補助画面を表示します。

❖ 詳しくは、添付の取扱説明書をご覧ください。

◆RT-160C（図12）

① 本体の電源を投入してください。

② 測定条件を設定します（各試薬のパラメーター表を参照してください。パラメーター表は弊社担当者に御要請ください。）。

③ 予備加熱終了後 、サンプルを測定部にセットし、ホットボンネットを閉めてください。

◇ 反応チューブの確認（ヒビ・キズ、気泡等）を確実におこなってください。

④ [Start/Heat]ボタンを押し、測定を開始します。

⑤ 16チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線、判定補助画面を表示します。

❖ 詳しくは、添付の取扱説明書をご覧ください。

❖反応後のチューブを検出部から取り出す際はチューブを破損しないように慎重に取り扱ってください。また反応チューブのキャップは、決して開けないでください。増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因になるだけではなく、試験環境を汚染し、汚染を除去しない限り、以後の試験で正しい結果が得られなくなる可能性があります。

図11. LA－320C本体（上）とサンプル測定部（下）

図12. RT－160C本体（上）とサンプル測定部（下）

VI. 結果判定

❑結果判定【領域D】

◆ 判定の前に（図13）

判定の際には以下の点を確認した上で実施してください。

- 陽性コントロール、陰性コントロールの反応が適切に進行している。
  - ◇ 正常な反応が行われている場合、陽性コントロール、陰性コントロールおよび検体の増幅曲線は図13のようなパターンを示します。
  - ◇ 陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していなければ、LAMP反応は正常に進行しています。
- 増幅モードの増幅曲線による濁度上昇の有無。

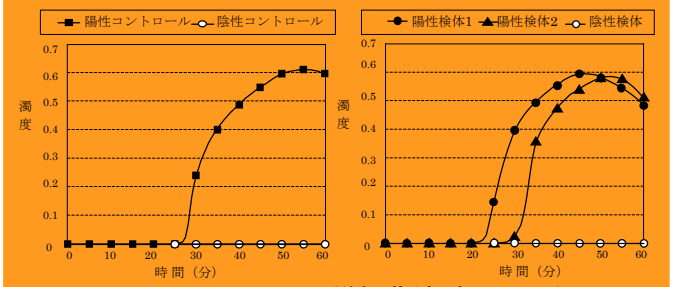

図13. コントロールの増幅曲線パターン（左）
検体の増幅曲線パターン（右）

◆ LA-320C（図14）

① 増幅モード

- 反応の増幅曲線を示します（縦軸：Abs、横軸：時間）

② 判定モード

- 測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示します（縦軸：微分値、横軸：時間）。

③ 結果モード

- 測定結果を棒グラフで表示し、判定カードの色で判定結果の確認ができます。
- 陽性－赤、陰性－緑、測定中－黄 （青－増幅分）

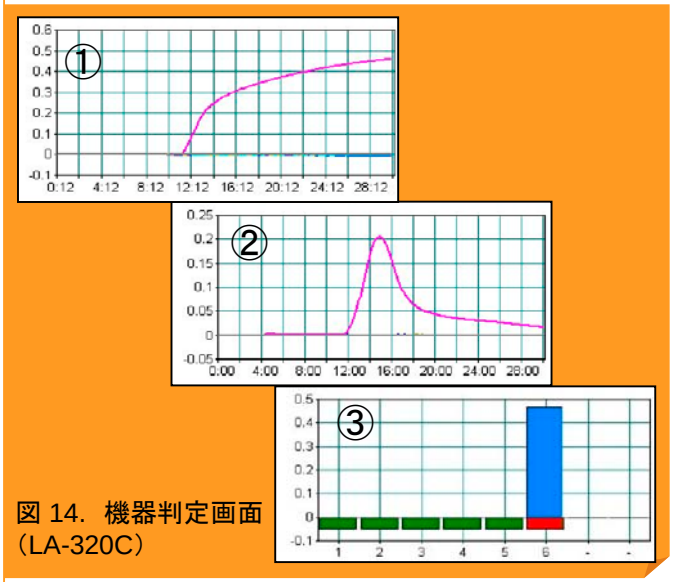

図 14. 機器判定画面
（LA-320C）

◆ RT-160C（図15）

① 増幅モード

- 反応の増幅曲線を示します(縦軸：Abs、横軸：時間)。

② 微分グラフ表示

- 測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示します（縦軸：微分値、横軸：時間）。

③ 数値表示

- 測定結果を吸光度、立上り時間、判定で表示します。

◆ 注意事項

- 上記装置による判定は陽性／陰性を確定するものではありません。あくまでも判定を補助するための機能です。
- 最終的な結果判定は、陰性／陽性コントロールを比較対象とし増幅曲線で濁度の上昇を確認することによって行ってください。
- 詳細内容および上記以外の装置およびLAMP法試薬を用いての判定に関しては、各機器・試薬の取扱説明書・添付文書をご確認ください。

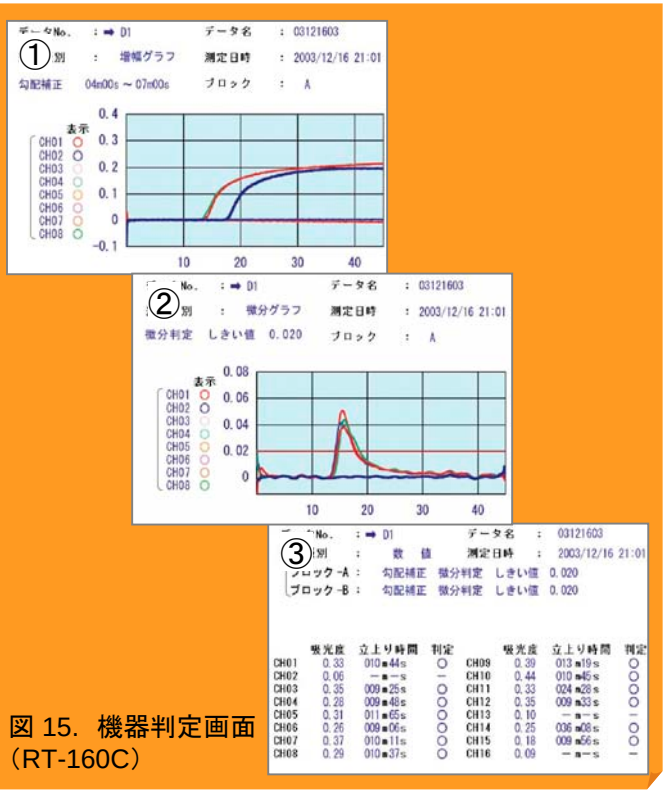

図 15. 機器判定画面
（RT-160C）

VII. 検査 フローチャート

前処理

抽出

領域B

食品 25g

↓

フィルター付きストマッカー用バッグ

□ + プレストン培地、CEM培地等 100mL

□ ← ストマッカー処理

□ ← 増菌培養液10mLを試験管に分注

□ ↓ ← 増菌培養 42℃、24時間・微好気条件下

増菌培養液 10mL

増菌培養液 ――→ 培養法へ

培養済菌液 50μL

↓

1.5mL 滅菌マイクロチューブ

□ + Extraction Solution for Foods (EX F) 50μL

□ ← 攪拌 ボルテックス

□ ← スピンダウン

□ ← インキュベート 95℃、5min

□ ← スピンダウン

□ + 10μL 1M Tris-HCl (pH7.0) (Tris)

□ ← 攪拌 ボルテックス

□ ← 遠心 2,000×g、室温 60sec

□ ← 氷冷

サンプル溶液 110μL

試薬調製・分注

領域A

滅菌マイクロチューブ

マスターミックス調製

テスト数	1test	＿＿＿test
2×Reaction Mix.(RM)	12.5 μL	＿＿＿μL
Primer Mix. Cam (PM Cam)	2.5 μL	＿＿＿μL
Distilled Water (DW)	4 μL	＿＿＿μL
Bst DNA Polymerase (Bst DNA Polymerase)	1 μL	＿＿＿μL

□ ↓ 分注 20μL/tube

□ Loopamp 反応チューブ

サンプル溶液添加

領域C

→ □ + 5μL/tube サンプル溶液・コントロール

← そのままピペッティングにて混和
- 5μL/tube サンプル溶液 【測定検体】
- 5μL/tube Positive Control Cam (PC Cam) 【陽性コントロール】
- 5μL/tube Distilled Water (DW)

← スピンダウン 気泡がないか確認

LAMP反応液 25μL

LAMP反応・検出

領域D

□ Loopamp 濁度測定装置

□ ← 電源投入

□ ← 表示温度確認 65℃

□ ← チューブをセット

□ ← 反応開始ボタン投入
LAMP反応 (65℃ 60min)
反応中、リアルタイム濁度測定・判定
反応停止 (80℃ 2min)

データ処理

Ⅷ. アッセイシート

DATE		KIT NAME		Lot. No.	
ASSAY Profile				SHEET No.	

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8

Position	Profile
A1	
A2	
A3	
A4	
A5	
A6	
A7	
A8	
B1	
B2	
B3	
B4	
B5	
B6	
B7	
B8	
C1	
C2	
C3	
C4	
C5	
C6	
C7	
C8	
D1	
D2	
D3	
D4	
D5	
D6	
D7	
D8	

Loopamp
LAMP法は、特異的に遺伝子を検出する
「簡易、迅速、精確、安価」な遺伝子検査を提供します。